台灣莧菜疫病之研究與病害防治

安寶貞[1,*] 蔡志濃[1] 王姻婷[1] 黃晉興[1] 林筑蘋[1] 王三太[2] 楊智凱[3]

[1] 農業試驗所植物病理組

[2] 農業試驗所鳳山熱帶試驗分所

[3] 農業試驗所農業工程組

[*] 聯絡作者；E-mail: pjann@tari.gov.tw; pjann5039@gamil.com

摘要

2007年春天在雲林縣西螺鎮蔬菜專業區內的多處莧菜園內發現嚴重疫病，發病時間自11月至翌年6月為止，12月至翌年4月發病較為嚴重，對莧菜產業造成嚴重威脅，該病害在國內外並未報導過，為一新病害。2007年1月至2013年12月共採集59處莧菜田的罹病組織，獲得116株莧菜疫病菌，該病菌僅為害莧菜與野莧，不為害其他蔬菜作物，為一新疫病菌，定名為*Phytophthora amaranthi*；病菌在8-32℃下可生長，在12-28℃下可誘發病害，最適生長與發病溫度均為20-24℃；並且在所有接種發病的罹病組織內形成大量卵胞子，可為殘存器官；病菌在病土中殘存期可長達2.5年以上，均可再誘發病害；含病菌之土壤中經60℃10分鐘便完全死亡。該菌對滅達樂的抗性為中等，在添加100 ppm的培養基上的生長率為對照處理的 26.7-43.6%。進行藥劑防治試驗，供試藥劑包括福賽得 (500×)、快得寧 (1500×)、亞磷酸 (500與1000×) 及達滅芬 (4000×)，結果所有藥劑均有良好的防治效果，但以達滅芬對葉部病害防治效果最佳，次為福賽得、亞磷酸及快得寧；但防治莖基部腐敗時，則以亞磷酸、福賽得較佳，達滅芬次之，快得寧最差。而物理方法將連作土壤蒸汽處理30 min或60 min，均可完全將土攘深度15 cm以內的疫病菌完全消滅，顯著降低疫病的發生。田間灌注1000 ppm 與2000 ppm的亞磷酸三次對莧菜疫病的防治效果甚佳，同時可以防治白銹病，並對下期作之莧菜疫病有良好之防治效果。

前 言

莧菜是我國重要的蔬菜之一，全年均可生產。2007 年 1 月至 4 月間，雲林縣西螺鎮蔬菜專業區莧菜園內首度出現疫病，無論紅莧或白莧均普遍發生，且植株之根、莖、葉均可被感染。罹病葉片初現灰綠色水浸狀斑點，而後擴大成直徑 3-5 cm 之灰褐色圓斑，病組織與健康部位無明顯界限，病徵與晚疫病十分相近；莖部與莖基部被感染時，組織褐變腐敗且出現隘縮情形，罹病株不久枯萎倒伏，有些罹病田在小苗期即嚴重發病，造成幼苗猝倒 (damping off)，因病情嚴重而犛田廢耕，農民損失甚大。莧菜疫病在世界尚未有報導，且試驗發現引起莧菜的疫病菌為一疫病新種 (安等 2008, Ann *et al.* 2015)。本報告即探討莧菜疫病的病因、病原、病原生態，及找尋病害防治方法，以解決農民病害問題。

莧菜疫病之發生與病菌之特性

莧菜疫病之發生與病徵

2007年1月至4月間，雲林西螺蔬菜專業區莧菜園內首度出現疫病，無論紅莧或白莧均普遍發生，且根、莖、葉均可被感染，但以葉片與莖基部發病最常見。葉片發病時，罹病葉片初現灰綠色水浸狀斑點，而後擴大成直徑3 cm之灰褐色圓斑，病組織與健康部位無明顯界限，病徵與晚疫病十分相近；莖部與莖基部時被感染時，組織褐變腐敗且出現隘縮情形，罹病株不久枯萎倒伏，有些罹病田因病情嚴重而犁田廢耕。根部罹病時，根系稀少且腐敗。經7年觀察，除 2009 年外，每年病害發生均很嚴重，嚴重時全園廢耕。莧菜疫病為中低溫病害，冬春季發病嚴重，夏秋季未曾發生，發病期為11月至翌年6月間，嚴重期為12-4月，依據收集之氣象資料顯示（資料未顯示），病害之嚴重度似乎與冬春季低溫降雨有密切關係。此外，該病害目前僅侷限於西螺地區，其餘如桃園、斗南、台南及屏東地區，均無發現該病害之蹤跡。

菌株分離、形態與生理特性描述

自2007~2011年經採集、分離及純化作業，在西螺地區共獲得 59 個地點的

116 個菌株。西螺菌株在 5%CV-8 上生長時無特殊花紋，氣中菌絲很少；在 PDA 上生長略為緩慢，具玫瑰花瓣狀花紋。孢囊 (sporangia) 在孢囊梗 (sporangiophores) 上呈假單軸狀 (simple sympodium) 著生或孢囊梗不規則分枝；孢囊具乳凸 (papilla)，乳凸顯著或不顯著，卵形、檸檬形或長橢圓形；部分孢囊具脫落性 (20-30%)，具有短梗，長度 (0.1-) 11.7 (-45) µm；代表菌株 TARI28041 之孢囊大小平均為 (40-) 52.2 (-70) × (30-) 38.2 (-50) µm，孢囊長寬比 (L/B) (1.1-) 1.37 (-1.86).；未發現厚膜胞子 (chlamydospores) 與菌絲膨脹體 (hyphal swellings)。所有菌株為同絲型 (homothallism)，藏卵器 (oogonial wall) 頂生，表面平滑；卵孢子 (oospores) 為非充實型 (aplerotic)；藏精器 (antheridia) 底著 (amphigenous)；代表菌株藏卵器、卵胞子及藏精器的大小平均為 (26-) 32.8 (-38) µm，(20-) 28.8 (-32) µm 及 (7.5-) 14 (-20) x (10-) 14.0 (-20) µm，屬Waterhouse分類群中的第2或第4群。代表菌株之菌絲生長範圍均為 8─32℃，最適溫為 24℃，每日直線生長速率約 0.7 cm。孢囊形成溫度為 (16-) 24 (-32)℃, 但溫度超過 >28℃時，形成的孢囊型態不正常；有性生殖的溫度則為 (8-) 20-24 (-28)℃。依據形態特性，該菌應為一尚無描述之新種疫病菌，將學名訂為 *Phytophthora amaranthi* Ann & Ko (Ann *et al*. 2015)。

病原性測定與發病生態

選擇3菌株 (包括代表菌株TARI28041等) 接種7品種系的莧菜與野莧 (包括台一、台二、Am69、Am79 、Am96、Am97及本所野莧)，除本所野莧品系外，白莧與紅莧均嚴重發病，且以白莧發病最嚴重。人工接種造成的病斑，與田間自然發病者相同，葉片、莖部與根系均會被感染。將接種發病的組織取回，均可再分離到原先接種的疫病菌。該菌具寄主專一性，接種其他蔬菜均不會發病，包括茄科 (番茄、番椒、茄子、馬鈴薯、煙草、龍葵)、十字花科（白菜、青江菜、油菜、甘藍）、瓜類（胡瓜、香瓜、西瓜等）、菊科蔬菜（萵苣、茼蒿）、波菜、茄子果實、胡瓜果實、馬鈴薯塊莖、蘿蔔塊根、胡蘿蔔、洋蔥鱗莖等。

ITS 與β-tubulin 序列分析

分析 16 株 (包括代表菌株TARI28041等) 西螺莧菌株之 ITS1-5.8S-ITS2 全長序列，均為753 bp，且序列相同度 (identity) 達100%。將代表菌株

TARI28041 (type culture) 與 TARI27147 的基因序列登錄於 NCBI 網站的資訊庫，代號為 GU111585 (type culture) 與 GU111584。並將序列上網比對，結果與資訊庫收集的 *Phytophthora capsici* (WPC6649B1553, GU259460.1) 最為相近，相似度高達 99.34%，僅有5個鹽基有差異。在 B-tubulin 部分基因序列（658 bp）分析方面，所有分析菌株的序列 identity 亦完全一致。代表菌株 TARI28041 (type culture) 與 p27147 的基因序列亦登錄於 NCBI 網站的資訊庫，代號為 KJ179949 (type culture) 與 KJ179948。亦將該序列上網比對，結果與資訊庫收集的 *Phytophthora capsici* [PD_00091, (P10386) EU079544.1] 最為相近，相似度高達98.78%，僅有8個鹽基有差異。

病原生態調查

致病濃度測定：選擇毒性 (virulence) 最強的菌株 2支 (代表菌株TARI28041與TARI27147)，將游走子懸浮液濃度10倍序列稀釋為每毫升含10^4、10^3、10^2 個游走子，再將病菌接種於生長10-14天大白莧的葉部與莖基部，置於 20℃下，測定誘致發病之最低濃度。每處理4株，實驗重複2次。結果顯示在 20℃下，病原菌游走子濃度10^4 以上時較易誘發病害，游走子濃度在10^2時發病率甚低，或不發病。

發病溫度：莧菜幼苗生長10-14天，以噴霧法接種，再置於不同溫度下，8-32℃ 每 4℃一間隔，測定發病範圍與最適溫度及會形成卵孢子之溫度。每處理 4株，實驗重複 2 次。該菌在 12-32℃ 下可誘發病害，最適合發病的溫度為20℃，其次為24℃與28℃。

病菌殘存：選擇毒性最強的菌株兩支 (代表菌株TARI28041與TARI27147)，以噴霧法接種植株發病後，觀察病菌在植株內的侵染與變化情形。同時將罹病組織與病菌埋於土壤中，調查病原菌於植株與土壤中的存活情形，每 6 個月調查一次。每處理至少接種 10 株植物，試驗重複 2 次，以明瞭病菌在植株殘體中存活時間長短。結果顯示，人工接種之罹病組織於接種 1-2 星期後均可形成卵胞子，溫度在 12-28 C下均會產生，但以 20C 下產孢最多。將罹病殘體埋於病土中，於 20-28℃ 的溫度下經過 2.5年以上，病土再次種植莧菜時仍會誘發嚴重病害，顯示病菌仍然存活。病菌於 12-28℃ 下均可存活，但以 16℃ 存活最佳，發病率在 56-81% 之間。

種子帶菌之可能性：利用選擇性培養基測定，檢測市售種子是否帶菌，但均無檢測到莧菜疫病菌。

菌株之抗藥性

目前共分離 116 株菌株，均對滅達樂略具抗藥性，在添加 10 ppm 與 100 ppm 滅達樂的培養基上可以稍許生長，在添加 100 ppm 的培養基上的生長率為對照處理的26.7-43.6%，為中等抗病。

莧菜疫病之防治

藥劑防治：測定藥劑對莧菜疫病的防治效果，供試藥劑包括亞磷酸、福賽得、快得寧及達滅芬。結果顯示，防治葉部疫害，以達滅芬 (4000×) 效果最佳 (完全沒有發病)、福賽得 (500×) 次之 (罹病度14.8 %)、亞磷酸 (500×與1000×) 再次之 (發病度分別為29.8 與 48.5%)，快得寧 (1500×) 效果較差 (罹病度61.0%)，但均比對照處理為佳 (罹病度87.5%)，而福賽得與亞磷酸 (500×) 會造成輕微藥害，葉緣稍微焦枯。

防治莧菜根部與莖基部疫病（黑骨病），則以亞磷酸 (稀釋100× 與 200×) 與福賽得 (200×) 效果最佳 (罹病率0%)，福賽得 (400×) (罹病率12.5%) 次之，達滅芬 (1000× 與 2000×) (罹病率分別為75% 與 87.5) 不佳，而對照處理完全死亡 (罹病率100%)。田間試驗有相似結果，以亞磷酸 (稀釋100×) 效果最佳 (罹病率4.3%)、亞磷酸 (200×) (罹病率5.3%) 與福賽得 (200×) (罹病率5.0%) 次之，福賽得 (400×) (罹病率7.0%)再次之，達滅芬 (2000×) (罹病率8.3%) 不佳，快得寧(500×)最差(罹病率12.3%)，與對照處理無顯著差異 (罹病率11.9%)。藥劑濃度與使用方法宜再調整。如果施用兩次，則亞磷酸、福賽得、達滅芬均可完全抑制莧菜莖基部疫病之發生。

此外，在試驗地（西螺）156.8 m^2 的試驗區上灌注 50 L 的亞磷酸中和液，濃度1000 ppm或2000 ppm，發病率分別為4.4% 與3.6%，而未使用區的發病率為15.1%，亞磷酸可以顯著降低莧菜疫病之發病率達60-90%，同時使用亞磷酸之處理的植株株高 (分別為 47.8 與 53.1 cm) 與單株株重 (分別為11.3 與 13.2 g) 亦較對照組 (分別為45.0 cm 與 10.1 g) 顯著優異。此外，施用亞磷酸對後期作亦有抑病效果，亞磷酸施用田完全無發病，而對照區發病率達10%以上。

土壤中病菌的耐熱性：將發病一個月的罹病組織與土壤以1:9混合，在經過不同溫度處理 10 min 或 30 min 後，再與土壤以 1:9 混合製成病土種植莧菜，經 60℃以上處理 10 min 的病土即不具導病性，所有栽植的莧菜完全存活，顯示病菌已經死亡。在50℃存活率為87%；40℃的存活率為81%；對照處理的存活率為59 %。此外，10 min 與30 min處理對病菌存活的影響差異不大。

土壤蒸汽處理：土壤經埋管覆蓋後，經蒸汽處理 30 min 或 60 min，土壤溫度可達80℃以上，均可完全將土攘中的疫病菌完全消滅，重植連作區幼苗未出現疫病，而對照處理的發病率達5.5%以上，土壤蒸汽處理可以顯著降低莧菜幼苗疫病之發病率；此外，處理區的平均植株的株重較重 (30 min 區百株重 375 g；60 min 區百株重 347.5 g) 且株高較高 (30 min 區株高平均 19.4 cm； 60 min 區株高平均 19.8 cm)，對照區的生長不良之矮化植株較多，百株重 130 g、株高平均 15.9 cm，分析差異顯著，顯示蒸汽處理對莧菜之連作障礙有相當的改善作用。

結 論

莧菜疫病菌 *Phytophthora amaranthi* 為一新疫病菌，具寄主專一性，除莧菜外，目前尚無其他寄主。該菌偏好中低溫，在8 -32℃可生長，最適合生長的溫度為 24℃；最適合發病的溫度為 20℃，一般在 11 月至翌年 6 月發生，12月至翌年 4月發病較頻繁。在最初發現的第一年 (2007) 與第二年 (2008) 病害發生十分嚴重，2009年相對輕微，但2010與2011年又相對較嚴重，該病害發生的嚴重度可能與溫度高低及降雨多寡有關，推測低溫 (20℃左右) 與降雨有利病害之發生。病原菌 *P. amaranthi* 為同絲型，在罹病組織內會產生大量卵孢子，為殘存器官，可以越夏與存活 2.5 年以上，為冬春季的初次感染源。目前該病害僅在台灣西螺一帶發現，其他如桃園、台南、屏東均未發現病害蹤跡。

在病害防治方面，防治莧菜葉部疫害，以達滅芬對防治效果最佳，其次為福賽得與亞磷酸，快得寧效果較差；但防治莖基部腐敗則以亞磷酸、福賽得較佳，達滅芬次之，快得寧最差。試驗中，高濃度（2000 ppm）之亞磷酸與福賽得 (稀釋200×) 會引起藥害，葉緣稍有焦枯，不宜使用。此外，在田間灌注 1000 ppm 與 2000 ppm 的亞磷酸三次對當期莧菜疫病的防治效果甚佳，它同時可以防治白銹病，並對下期作之莧菜疫病有良好之防治效果。

疫病菌為好氣性，依據本試驗誘釣方訪檢測結果顯示，莧菜疫病菌在表土 15 cm 以下存活的機率很低，並無撿出。而莧菜園內亦存在腐霉菌 (*Pythium* spp.)，腐霉菌在表土深度 0-35 cm 處密度相當高，與疫病有相當差異。罹病田土壤埋管覆蓋後，經蒸汽處理 30 min 或 60 min，土壤溫度可達80℃以上，均可完全將土攘中20 cm 以內的疫病菌與腐霉菌完全消滅，但是無法完全殺死表土 15 cm 以下的 *Pythium*。蒸汽處理可以顯著降低莧菜幼苗猝倒病之發病率；但幼苗猝倒病在蒸汽處理田與對照田之菌相不一，蒸汽處裡田的菌相以腐霉菌為主，而對照田包括腐霉菌、疫病菌及立枯絲核菌，顯示蒸汽處理對疫病菌與立枯絲核菌之殺滅效果較佳。莧菜採收前，調查植株基腐病 (basal stem rot) 之發生情形，發現各處理普遍發生，差異不顯著，但蒸汽處理區的較高大植株較多，平均重量較重；對照區的植株生長不良之矮化植株較多，分析差異顯著，顯示蒸汽處理對莧菜之連作障礙有相當的改善作用。

參考文獻

1. 安寶貞、王姻婷、黃晉興、蔡志濃、王三太. 2008. 莧菜疫病. 植病會刊 17:69-70.（摘要，論文宣讀）
2. 徐世典等. 2002. 植物病害名彙 (四版). 植病學會刊印. 386 頁.
3. Ann, P. J., Huang, J. H., Tsai, J. N., and Ko, W. H. 2014. Morphological, molecular and pathological characterization of *Phytophthora amaranthi* sp. nov. from amaranth in Taiwan. J. Phytopathol. (排版中) doi 10.111/jph.12433
4. Boesewinkel H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. Trans Br Mycol Soc 66: 183-185.
5. Cooke D. E. L, Drenth A., Duncan J. M, Wagels G., Brasier C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genet Biol 30:17-32.
6. Erwin, D., and O. Ribeiro. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. APS press. Minnesota. 562 pp.
7. Gallegly ME, Hong C. (2008) *Phytophthora*: Identify Species by Morphology and DNA Fingerprints. St. Paul, MN, APS Press. 158 p.
8. Ho, H. H., Ann, P. J., and Chang, H. S.1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. Acad. Sin. Mon. Ser. 15. Taipei, Taiwan, ROC. 86 pp.

9. Hwang S. C., Ko W. H., Aragaki M. (1975) A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. Mycologia 68:1233-1234.
10. Ko, W. H., H. S. Chang, and H. J. Su. 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71:496-499.
11. Stamp D. J., Waterhouse G. M, Newhook F. J., Hall G. S. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. Mycol. Pap. 162,
12. Villa N. O., Kageyama K., Asano T., Suga H.. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β-tubulin gene sequences. Mycologia 98:410–422.
13. Waterhouse, G. M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 92, CMI, Kew Surrey, England. 21 pp.
14. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Snirsky JJ, White TJ. Eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, Academic Press, p 315-322.

Studies on Phytophthora Disease of Amaranth and Its Control in Taiwan

Ann, P. J.[1,*], Tsai, J. N.[1], Wong, I. T.[1], Huang, J. H.[1], Lin, C. P.[1], Wang, S. T.[2], and Yang, C. K.[3]

[1] Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), ROC
[2] Fengshan Tropical Horticultural Experiment, TARI, Kaohsiung, Taiwan, ROC
[3] Agricultural Engineering Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
[*] Corresponding Author: pjann5039@gamil.com

ABSTRACT

In the spring of 2007, a serious disease on amaranth was noticed in several farms in the major amaranth production area in central Taiwan. Abundant oospores were found in the disease tissues. A species of *Phytophthora* was consistently isolated from disease tissues. Morphological characteristics of this organism did not match any reported *Phytophthora* species and the organism was named *Phytophthora amaranthi*. Pathogenicity tests and molecular characterization confirmed the identity of the organism as a new pathogen of amaranth and a new species of *Phytophthora*. The disease generally occurred from November to June of the next year with the most severe periods from December to next April. A total of 116 isolates from 59 fields were obtained. The pathogen was with host specificity; it only attacked amaranth species but not any other vegetable crops. In the fields, the *Phytophthora* attacked root, basal stem and leaf of the host and caused root and basal stem rot, and leaf blight, respectively. The ranges of temperatures for supporting pathogen growth were from 8 to 32℃ and for inducing disease from 12 to 28℃, with optimum growth and disease development at 20-24℃. A large number of oospores were formed in all the diseased tissues under all the temperatures suitable for disease development. The pathogen could survive as oospores in the soil for more than 2.5 years. All the isolates were slightly resistant to metalaxyl. They can growth at media amended with 10 ppm chemicals. The effects of chemicals on disease control were evaluated. The test chemicals included neutralized phosphorous acid (NPA), Fosetyl-aluminum, oxine copper and dimethomorph. Resulted showed that the best chemical for control of leaf blight was dimethomorph (4000x), followed by Fosetyl-aluminum (500x) and NPA

(500 and 1000x), oxine copper was the worst (1500×). While for inhibition of root and basal stem rot in the green house and field studies, NPA (100 & 200x) and Fosetyl-aluminum (200x) were the best. The soil disinfection with steam for 30 minutes or 60 minutes can completely kill the pathogen in the soil depth of 20 cm and significantly reduced the disease incidence of seedling dumping-off and Phytophthora basal stem root. Meanwhile the effect of soil steaming on suppression of Phytophthora disease was better than the Pythium diseases. Result of field study showed that soil drenching with 1000 ppm and 2000 ppm NPA for 3 times could effectively inhibit Phytophthora disease as well as white rust disease of amaranth in the field, meanwhile the control effect of phosphorous acid could last to next plantation.